

## 明細書

## 培養器

## 技術分野

[0001] 本発明は試料細胞へ応力を発生させつつこれを培養する培養器に関する。

## 背景技術

[0002] 試料細胞に応力を発生させつつこれを培養すると、この応力が刺激となって培養される細胞に特定の変化が生じることが知られている。

従来から、培養試料細胞へ応力をかけるための方法が提案されている。

例えば試料細胞を乗せた容器の底膜を吸引することによりこれを変形させ、もって試料細胞へ応力を発生させる技術が特許文献1～3に開示されている。

[0003] 本発明者らは培養器底膜を吸引装置により変形させる方法では試料細胞へ均等に応力をかけることが困難であると考え、培養器の底膜と平行な方向の引っ張り力を当該培養器へ加える方式に着目してその検討を進めてきた(非特許文献1参照)。

この培養器1において、図1に示すように、例えばフィプロネクチンを塗布した厚さ200 μmの透光性かつ変形可能な培養膜3に試料細胞を乗せ、培養膜3の対向する一対の辺には(厚さ:400 μm)側壁5、5が設けられる(非特許文献1参照)。厚い側壁5を用いるのは試料細胞を乗せた培養膜3を均一に伸展させるためである。

[0004] 図1において側壁5には係合孔7が形成されている。

この係合孔7へ伸展装置10のピン(図示せず)が挿入される。

伸展装置10は、図2に示すように、固定プレート11、可動プレート13、ステップモータ15及び制御装置17を備えてなる。

固定プレート11及び可動プレート13には所定の位置にピンが形成されており、各ピンへ培養器1の係合孔7が嵌合される。可動プレート13はステップモータ15の回転に応じて固定プレート11との距離が変化する。これにより培養器1の培養膜3が伸展し、もって試料細胞に応力がかけられこととなる。ステップモータ15の回転は制御装置17により制御されている。

[0005] 本件発明に関連するものとして、特許文献1～6も参考されたい。

- [0006] 特許文献1:米国特許第4789601号公報
- 特許文献2:米国特許第4822741号公報
- 特許文献3:米国特許第4839280号公報
- 特許文献4:特開2003-61642号公報
- 特許文献5:米国特許第6107081号公報
- 特許文献6:国際公開WO02/46365号公報

非特許文献1: Involvement of SA channels in orienting response of cultured endothelial cells to cyclic stretch, the American Physiological Society, 1998, H1532-1538, KEIJI NARUSE et al.

### 発明の開示

#### 発明が解決しようとする課題

- [0007] 上記図1に示した培養器を用いても細胞に所望の応力を加えることが可能であった

しかしながら、昨今の細胞培養の分野においてはより精緻に制御された条件下での研究開発が求められている。そこで本発明者らは、細胞へより均一に応力をかけるべく培養器の検討を進めてきた。

従って、この発明の第1の目的は細胞へ極めて均一な応力をかけられる培養器を提案することにある。

この発明の他の目的は細胞の再生などに適した広い面積の培養器において細胞へ均一に応力をかけられる培養器を提案することにある。

#### 課題を解決するための手段

- [0008] この発明は上記課題の少なくとも一つを解決すべくなされた。即ち、変形可能な材料で形成されている矩形箱状の培養器であって、底膜及び該底膜の全周縁から立設する側壁を備え、対向する一対の前記側壁には前記底膜の周縁の延長線上に係合部が形成されている培養器。

#### 発明の効果

[0009] このように構成された培養器によれば、試料細胞をのせる底膜の全周から側壁が立設されているので、底膜が無秩序に変形し試料細胞に予定外の応力がかかるのを防止できる。また、伸展装置の力がかかる係合部は剛性の高い側壁において底膜の伸び方向の周縁の延長線上にあるので、底膜を均一に伸張させることができる。すなわち、底膜を伸張させるとき、伸び方向の周縁はその中央がくぼむように変形しがちであるが、係合部を介して当該周縁へ直接的に力を付加することにより、当該変形を防止することができる。これにより、底膜上の試料細胞へ均一な応力をかけられることとなる。

[0010] この発明の他の局面によれば、底膜から係止部を設けてこの係止部に試料細胞が係止するようにした。底膜と試料細胞との間にすべりが生じると底膜が均一に伸張しても試料細胞へ均一に応力がかかるないおそれがある。  
ここに、底膜に係止部を設けてこれを試料細胞へ係止させれば底膜と試料細胞とのすべりを未然に防止することができる。よって、均一に伸張された底膜により試料細胞へ均一に応力をかけられることとなる。かかる係合部を複数設けることにより底膜(培養膜)の面積が広くなてもその全範囲において底膜-試料細胞間のすべりを防止できる。かかる広い面積の培養膜は細胞の再生用として好適である。

#### 図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1は従来例の培養器とその伸展装置を示す。

[図2]図2はこの発明の実施例の培養器の斜視図である。

[図3]図3は同じく実施例の培養器を示し、(A)は平面図、(B)は正面図、(C)は底面図、(D)は右側面図である。

[図4]図4は図3におけるA-A線断面図である。

[図5]図5は実施例の培養器の使用態様を示す断面図である。

[図6]図6はこの発明の他の実施例の培養器の斜視図である。

[図7]図7は同じく実施例の培養器を示し、(A)は平面図、(B)は正面図、(C)は底面図、(D)は右側面図である。

[図8]図8は図7におけるA-A線断面図である。

[図9]図9は底膜に形成される係止部の変形態様を示す。

## 発明の実施の形態

[0012] 以下、この発明の各要素について詳細に説明する。

この発明の一つの局面では培養器として矩形箱型のものを用いた。培養器を矩形箱型とすることにより消耗品である培養器の運搬及び保管が容易になる。

かかる培養器は変形可能な材料で形成されている。これは、培養器を伸展することにより間接的に試料細胞へ応力をかけるためである。

培養器の形成材料としてシリコーンエラストマーなどの試料細胞へ化学的に干渉しないものが用いられる。

[0013] 底膜は平面視矩形として、均一に伸展するように全体が同じ膜厚に形成されることが好ましい。光学顕微鏡で試料細胞を観察可能なように底膜は光透過製材料で形成されることが好ましい。

底膜の全周から側壁を立設させることが好ましい。側壁を厚膜としてこれに機械的な剛性を付与する。これにより、底膜が無秩序に変形することを防止できる。

底膜と側壁とは一体であることが部品点数削減、ひいては製造コスト削減の見地から好ましいが、底膜と側壁とを別体にすることを制限するものではない。

[0014] 矩形底膜の対向する一対の縁に設けられた側壁には係合部が設けられている。この係合部が伸展装置の固定プレート、及び移動プレートと係合すればよい。これにより、相対位置を制御可能な当該2つの部材の位置変化が培養器を変形させることとなる。

したがって、側壁から突起を設けてこれをプレートに係合させることもできる。2つのプレートを共に変動させることも可能である。

[0015] 底膜が伸張されたとき当該伸張方向の周縁はその中央部が窪むように変形する。このような変形が生じると変形部分上の試料細胞にかかる応力の方向が他の部分のものと異なってしまう。

そこでこの発明の係合部は、矩形底膜の伸張方向の周縁の延長線上に形成される。これにより、係合部に加えられた力が当該底膜の伸長方向の周縁へ加わり、これが確実に引っ張られる。よって、当該周縁の変形が防止され、もって底膜上の全試料細胞へ均一な応力をかけられることとなる。

この発明の培養器に使用される試料細胞の種類及び入手方法は特に限定されるものではない。例えば、血管内皮細胞(ヒト・サル・ブタ・ウシ・ラット・マウス・ウサギなど)、平滑筋細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、線維芽細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、破骨細胞、神経細胞などを使用することができる。

### 実施例 1

[0016] 以下、この発明を実施例に基づいて更に詳細に説明する。

図2はこの実施例の培養器21を示し、図2はその斜視図、図3(A)は平面図、図3(B)は正面図、図3(C)は底面図、図3(D)は右側面図である。なお、左側面図は図3(D)と同じであるため省略した。図4は図3(A)におけるA-A線断面図である。図5は使用態様図である。

実施例の培養器21は透明なシリコーンエラストマーで型成形された箱型であり、薄い底膜23と底膜23の周縁から一体的に立設した側壁25、26からなる。底膜23は約100 μm若しくは約200 μmの膜厚であり、側壁25は約1cm、側壁26は約2mmの厚さである。側壁25には係合孔27が形成されている。

底膜23の表面には細胞を着床させるためにフィプロネクチンやコラーゲンなどが塗布される。

[0017] 図5には、実施例の伸展装置30を示す。この伸展装置30において固定プレート31はレール板36に固定され、可動プレート33はレール板36上に摺動自在に載置される。固定プレート31、可動プレート33からはそれぞれピン32、34が突設され、培養器21の係合孔27へ挿入される。

可動プレート33はロッドを介してステップモータ35の回転に伴い図示矢印方向へ移動する。符号37はステップモータ35の回転を制御する制御装置であり、実施例ではコンピュータ装置を用いた。

ステップモータ35を回転させて可動プレート33を固定プレート31から離隔する方向に移動させると、ピン34を介してその力が培養器21の側壁25へ伝達される。これにより、底膜23が周縁24の延長線方向へ伸張される。

[0018] このとき係合孔27は、図3(A)に示すように、底膜23の周縁24、24の延長線上に位置する。より好ましくは、図示のように、当該延長線が係合孔27の外縁部と一致す

るようとする。これにより、ピン32-ピン34による力が底膜23の周縁24へより直接的にかかることになる。よって、当該周縁24の窪みが防止され底膜23が均一に伸展される。よって、底膜23の上の試料細胞29にかかる応力が均一となる。

## 実施例 2

[0019] 図6-図8に他の実施例の培養器41を示す。前の実施例と同一の要素には同一の符号を付してその説明を部分的に省略する。

この実施例の培養器41においては、底膜23から突起43が形成されている。この突起43は試料細胞29へ干渉してこれと底膜23とのすべりを防止する。よって、試料細胞29に対する均一な応力の付加が可能になる。

この突起43をポーラスにすることにより突起と試料細胞との係止力が向上する。

[0020] 突起43は試料細胞29へ係止し、これと底膜23とのすべりを防止するものである。かかる作用は、図9(A)に示すような凹部45、図9(B)に示すような小さな突起47、図9(C)に示すような溝49でも達成できる。これらの凹部45、突起47、溝49は底膜23の周縁24に対して交差する方向(好ましくは直交する方向)に連続していくも、また非連続であってもよい。

[0021] この実施例では矩形箱型の培養器における培養膜である底膜へ係止部を設けたが、培養器の形状構造は特に限定されるものではない。例えば、吸引により変形されるタイプの培養膜へ当該係止部を設けることもできる。

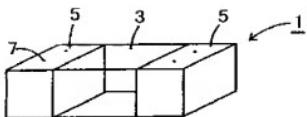
[0022] この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

## 請求の範囲

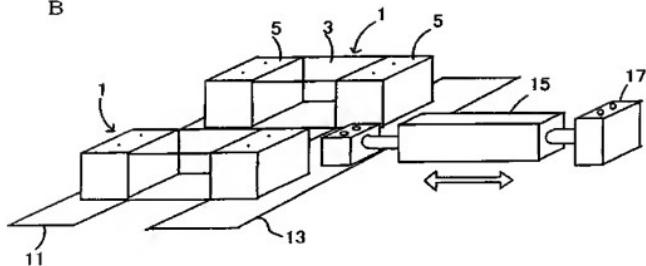
- [1] 変形可能な材料で形成される矩形箱状の培養器であって、底膜及び該底膜の周縁から立設する側壁を備え、対向する側壁には前記底膜の周縁の延長線上に係合部が形成されている培養器。
  - 。
- [2] 係合部の外縁と前記底膜の周縁とが実質的に同一線上に位置する、ことを特徴とする請求項1に記載の培養器。
- [3] 前記底膜から試料細胞に係止する係止部が形成されている、ことを特徴とする請求項1又は2に記載の培養器。
- [4] 前記底膜と前記側壁とは一体成型され、前記底膜は透光性である、ことを特徴とする請求項1-3のいずれかに記載の培養器。
- [5] 変形可能な材料で形成される矩形箱状の培養器であって、底膜及び該底膜の周縁から立設する側壁を備え、前記底膜から試料細胞に係止する係止部が形成されている培養器。
- [6] 前記係止部は突起である、ことを特徴とする請求項5に記載の培養器。
- [7] 前記突起はポーラスである、ことを特徴とする請求項6に記載の培養器。
- [8] 変形可能な試料細胞培養膜を有し、該試料細胞培養膜から試料細胞に係止する係止部が形成されている、培養器。

[図1]

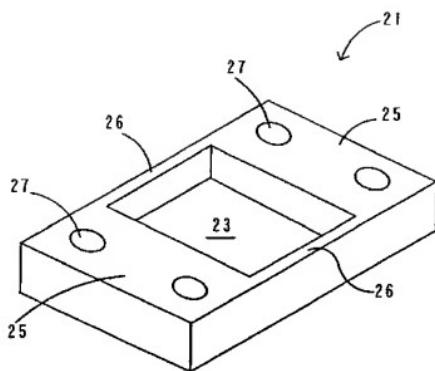
A



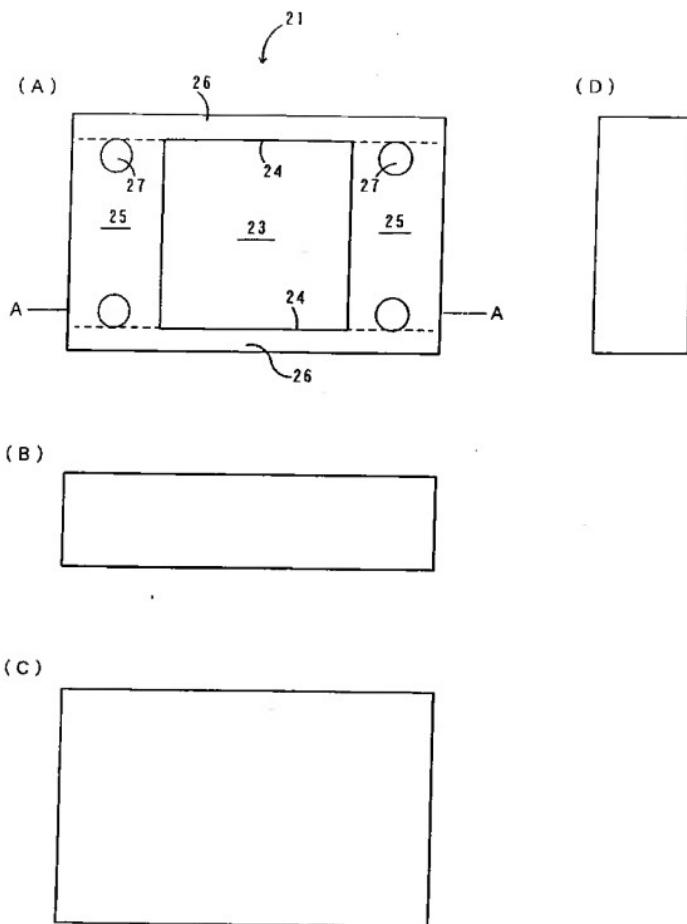
B



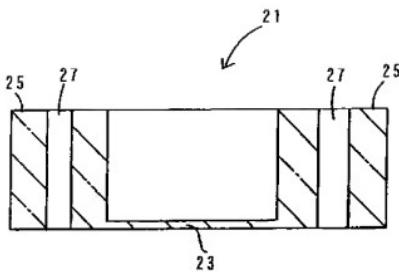
[図2]



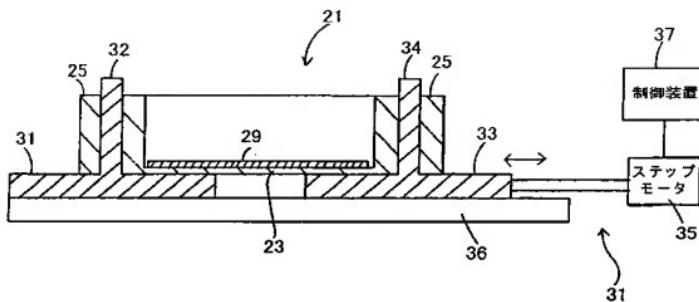
[図3]



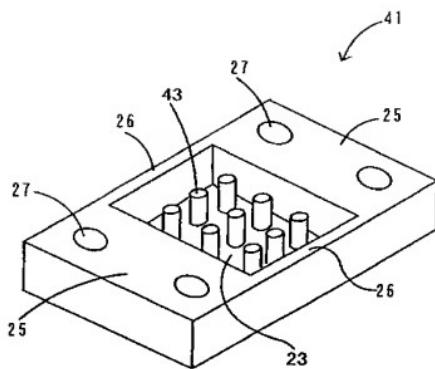
[図4]



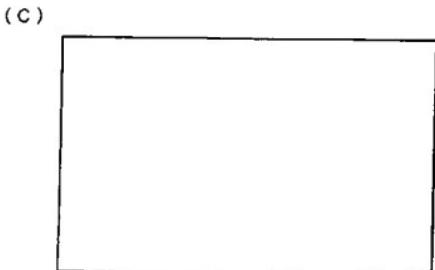
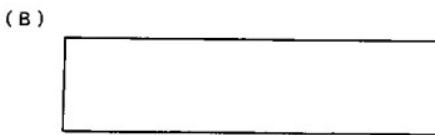
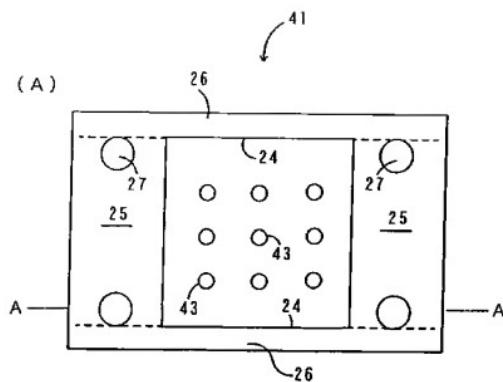
[図5]



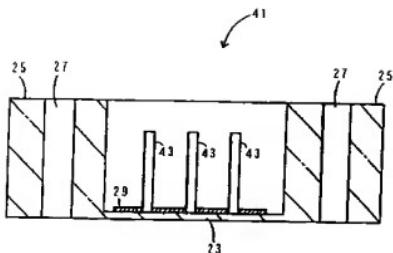
[図6]



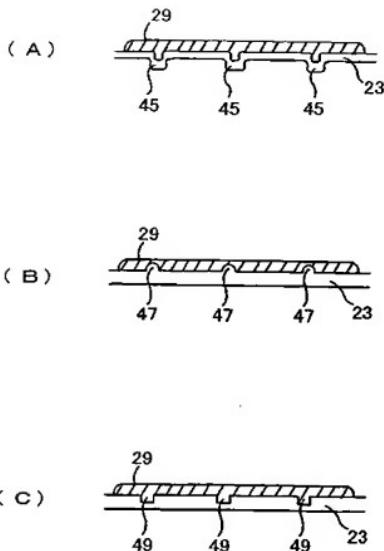
[図7]



[図8]



[図9]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/004043

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int. Cl<sup>7</sup> C12M3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int. Cl<sup>7</sup> C12M3/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS/MEDLINE/WPIIDS (STN), Capplus (STN), JSTPlus (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NAKAGAKI, M. et al., "Saibo-yo Nijiku Kurikaeshi Incho Kiko no Kaihatsu to Kore o Mochiita Kekkan Naihi Saibo no Rikigaku Oto no Kaiseki", Bio Frontier Koenkai Koen Ronbunshu, (2003), Vol.14, pages 7 to 8, full text	1,2,4
Y	NARUSE, K. et al., "Shinten Shigeki to Kekkan Naihi Saibo, Shinten Shigeki no Hoho to Saibo Oto no Kaisekiho", Japanese Journal of Medical Electronics and Biological Engineering, (1998), Vol.36, No.3, pages 287 to 292, full text	1,2,4

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"G" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
06 June, 2005 (06.06.05)Date of mailing of the international search report  
28 June, 2005 (28.06.05)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/004043

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SOKABE, M. and NARUSE, K., "Baiyo Saibo eno Kakushu Shinten Shigekiho Sono Riten to Ketten", The Tissue Culture, (1996), Vol.22, No.10, pages 413 to 417, full text	1, 2, 4
A	NARUSE, K. et al., "Involvement of SA channels in orienting response of cultured endothelial cells to cyclic stretch", American Physiological Society, (1998), pages H1532 to H1538, full text	1-8
A	JP 2003-61642 A (Takagi Industrial Co., Ltd.), 04 March, 2003 (04.03.03), Full text & EP 1428869 A1 & WO 2003/029398 A1	1-8
A	CLARK, C.B. et al., "Uniaxial strain system to investigate strain rate regulation in vitro", Rev.Sci.Instrum., (2001), Vol.72, No.5, pages 2415 to 2422, full text	1-8
A	US 5217899 A (The General Hospital Corp.), 08 June, 1993 (08.06.93), Full text (Family: none)	1-8

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP2005/004043

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
  
  
  
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
  
  
  
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

It appears that the matter common to all of claims 1 to 8 resides in "a culture device having a deformable culture membrane (bottom membrane)".

However, it is clarified that "a culture device having a deformable culture membrane (bottom membrane)" is not novel because of having been reported in a document disclosed as prior art in the specification (NARUSE, K. et al., "Involvement of SA channels in orienting response of cultured endothelial cells to cyclic stretch", American Physiological Society, (1998), pp.H1532-H1538).

Therefore, the inventions as set forth in claims 1 to 8 are divided into two groups, i.e., those having a special technical (continued to extra sheet)

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
  
  
  
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

## Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/004043

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

feature in "a culture device in the shape of a rectangular box which has side walls upstanding from the whole periphery of the bottom membrane" and those having a special technical feature in "a culture device in which an engaging member is formed for engaging sample cells to the culture membrane (bottom membrane)".

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> C12M3/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> C12M3/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/SPIDS(STN)  
CAplus(STN)  
JSTplus(JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	NAKAGAKI,M. et al., "細胞用二軸線返引張機構の開発とこれを用いた血管内皮細胞の力学応答の解析", バイオフロンティア講演会講演論文集,(2003), Vol.14, pp.7-8, 全文	1,2,4
Y	NARUSE,K. et al., "伸展刺激と血管内皮細胞 伸展刺激の方法と細胞応答の解析法", 医用電子と生体工学,(1998), Vol.36, No.3, pp.287-292, 全文	1,2,4

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「T」優先権主張に延長を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために利用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

06.06.2005

## 国際調査報告の発送日

28.6.2005

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

4B 3334

伏見 邦彦

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C(続き)	関連すると認められる文献	
引用文献の カテゴリーエ	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	SOKABE,M. and NARUSE,K, “培養細胞への各種伸展刺激法 その利点と欠点”, 組織培養, (1996), Vol.22, No.10, pp.413-417, 全文	1,2,4
A	NARUSE,K. et al, "Involvement of SA channels in orienting response of cultured endothelial cells to cyclic stretch", American Physiological Society, (1998), pp.H1532-H1538, 全文	1-8
A	JP 2003-61642 A, (高木産業株式会社), 2003.03.04, 全文 & EP 1428869 A1 & WO 2003/029398 A1	1-8
A	CLARK,C.B. et al, "Uniaxial strain system to investigate strain rate regulation in vitro", Rev.Sci.Instrum., (2001), Vol.72, No.5, pp.2415-2422, 全文	1-8
A	US 5217899 A, (The General Hospital Corp.), 1993.06.08, 全文 (ファミリーなし)	1-8

## 第二回 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第三回 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-8のすべてに共通の事項は、「変形可能な培養膜(底膜)を有した培養器」であると認める。

しかしながら、「変形可能な培養膜(底膜)を有した培養器」は、明細書に從来技術として開示された、文献(NARUSE,K. et al., "Involvement of SA channels in orienting response of cultured endothelial cells to cyclic stretch", American Physiological Society, (1998), pp.H1532-H1538)に記載されているから、新規でないことが明らかとなった。

それ故、請求の範囲1-8に記載の発明は、「矩形箱状の培養器であって、底膜の全周縁から立設する側壁を備えた培養器」に特別な技術的特徴を有するもの、「培養膜(底膜)から試料細胞に係止する係止部が形成されている培養器」に特別な技術的特徴を有するもの、2つに分類される。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている差明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。